

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA, KAROLINA ROGOZIŃSKA

*Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: j.kramska@nencki.gov.pl*

ZMYŚŁ WĘCHU – KODOWANIE ZAPACHÓW – NAGRODA NOBLA Z FIZJOLOGII LUB MEDYCYNY W 2004 ROKU

Ubiegłoroczna Nagroda Nobla z Dziedziny Fizjologii lub Medycyny została przyznana dwojgu amerykańskim uczonym: Richardowi Axelowi i Lindzie Buck, za badania zmysłu węchu. Ich prace dotyczyły odpowiedzi na fundamentalne pytanie, jak środowisko zewnętrzne jest reprezentowane w mózgu, a w tym szczególnym przypadku, jak mózg odczuwa zapachy? Tym samym Nagrodą Nobla zostały uhonorowane odkrycia z dziedziny badań podstawowych z zakresu fizjologii. Pionierska, wspólna praca autorstwa obojga laureatów ukazała się w *Cell* (AXEL i BUCK 1991). Zaprezentowano w niej wyniki uzyskane w laboratorium Richarda Axela w Howard Hughes Medical Institute (Uniwersytet Columbia) w Nowym Yorku, gdzie Linda Buck przebywała na stażu podoktorskim. Później, pracując już niezależnie, ale równolegle, a zarazem komplementarnie, laureaci uzyskali wyniki, które wyjaśniają, jakimi drogami nerwowymi informacja o określonym zapachu dociera do mózgu i jak jest w układzie nerwowym kodowana.

Należy podkreślić, że Linda Buck jest 7. kobietą uhonorowaną tą zaszczytną nagrodą w dziedzinie fizjologii lub medycyny.

Substancje zapachowe niosą dla organizmu szereg ważnych informacji, które wpływają na jego zachowanie. Ostrzegają o zagrożeniu, regulują pobieranie pokarmu, informują o atrakcyjności seksualnej, wpływają na emocje. Człowiek jest zdolny do rozróżniania tysięcy substancji zapachowych i różnie odczuwa ich stężenie. Na przykład, przyjemny zapach bzu zawdzięczamy skatolowi, ale substancja ta w dużym stężeniu daje odczucie odrażającego zapachu.

Organem, który wykrywa substancje zapachowe jest nos, a właściwie nabłonek węchowy wyściełający jamę nosową. W nabłonku znajduje się kilka milionów neuronów węchowych. Na zakończeniach ich zmodyfikowanych dendrytów występują włosowate wypustki, miejsca gdzie wykrywana jest substancja zapachowa (Ryc. 1). Z kolei, aksony neuronów węchowych biegną do opuszki węchowej i tam tworzą kłębki zwane glomerulami, gdzie znajdują się synapsy na dendrytach komórek mitralnych. Potem informacja przenoszona jest do wyższych pięter układu nerwowego, w tym do pierwszorzędowej kory węchowej i innych obszarów mózgu (Ryc. 2). U zwierząt, np. u gryzoni, występuje dodatkowo oddzielny układ przenoszący informacje o substancjach chemicznych – feromonach. W jego skład wchodzi: organ Jacobsona (nosowo-lemieszowy) i dodatkowa opuszka. Powstawało pytanie, jakie receptory umożliwiają rozróżnienie tysięcy substancji zapachowych. W przypadku innych zmysłów wiadomo było, że repertuar receptorów jest ograniczony. Oko ma zaledwie trzy typy receptorów reagujących na kolory: czerwony, żółty i niebieski, ale jest w stanie rozróżnić szereg kolorów i ich odcieni. Język jest zdolny rozróżnić 5 smaków przy pomocy 28 różnych receptorów smakowych. Do lat 80. ubiegłego stulecia sposób identyfikacji i przetworzenia sygnału niesionego przez substancje zapachowe pozostawał tajemnicą.

Buck i Axel, poszukując odpowiedzi na pytanie o receptory zapachowe, posłużyli się warsztatem biologii molekularnej. Przystępując do badań przyjęli następujące założenia:



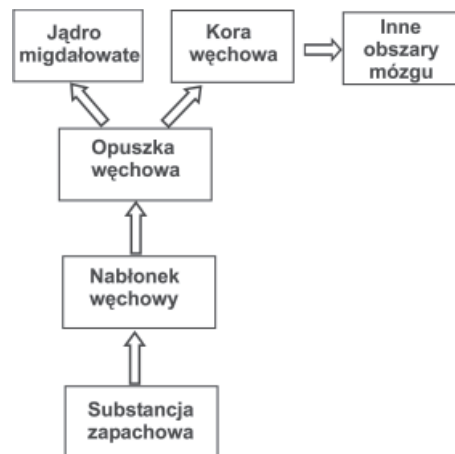
Ryc. 1. Schemat nabłonka węchowego.

1) receptory zapachowe należą do nadrodziny białek receptorowych, które charakteryzują się obecnością siedmiu domen transbłonowych i są sprzężone z białkiem G;

2) receptory zapachowe tworzą bardzo liczną rodzinę białek, co umożliwia identyfikację bardzo wielu strukturalnie różnych substancji zapachowych;

3) ekspresja receptorów zapachowych jest ograniczona do nabłonka węchowego.

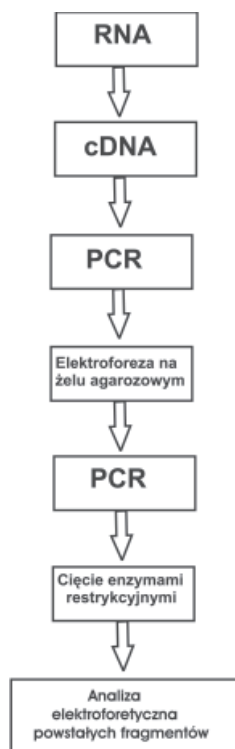
Użyta przez noblistów strategia polegała na wyizolowaniu RNA z nabłonka węchowego myszy, następnie otrzymaniu cDNA i zastosowaniu PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy). Do reakcji PCR użyto starterów zaprojektowanych tak, aby amplifikować fragment genu receptora odpowiadający regionowi białka pomiędzy drugą i siódmą domeną transbłonową. Tymi starterami były zdegenerowane oligonukleotydy o różnej homologii do konserwowanych ewolucyjnie sekwencji drugiej i siódmej domeny transbłonowej. Uzyskane produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym i określono ich ciężar cząsteczkowy. Spośród wielu produktów reakcji PCR wybrano do dalszych badań tylko te, których wielkość zawierała się w przedziale 600–1300 par zasad (domniemany przedział wielkości dla tych receptorów). Następnym krokiem było cięcie tych wyjściowych DNA przy użyciu enzymów restrykcyjnych (endonukleaz) i ponowna analiza elektroforetyczna w celu zidentyfikowania takiego produktu PCR, który zawierałby różne sekwencje DNA zamplifikowane przy użyciu tej samej pary starterów (Ryc. 3). Buck



Ryc. 2. Schemat układu węchowego.

i Axel rozumowali bowiem, że trawienie produktu reakcji PCR, który składa się wyłącznie z jednego rodzaju sekwencji DNA, wygeneruje fragmenty, których ciężar cząsteczkowy jest sumą ciężarów cząsteczkowych wyjściowego produktu. Jeśli zaś produkt wyjściowy składa się z różnych sekwencji DNA, to po trawieniu powstaną fragmenty, których suma ciężarów cząsteczkowych znacznie przewyższy ciężar wyjściowego produktu PCR. Okazało się, że w jednym przypadku suma ciężarów fragmentów DNA uzyskanych po enzymatycznym cięciu była większa niż ciężar cząsteczkowy wyjściowego DNA. Ten wynik dowodził, że w wyjściowym produkcie PCR (o wielkości 710 par zasad) obecne są różne sekwencje DNA. Produkt ten klonowano i 5 z uzyskanych klonów zsekwencjonowano. Okazało się, że każdy z tych klonów miał inną sekwencję DNA, ale każda z nich kodowała fragment białka o cechach charakterystycznych dla nadrodziny receptorów z siedmioma domenami transbłonowymi. Stwierdzono ponadto, że w białkach kodowanych przez te 5 genów występują charakterystyczne sekwencje (motywy) zupełnie różne od tych, które są obecne w innych, znanych białkach receptorowych sprzężonych z białkiem G. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że sklonowane geny kodują białka należące do nowej rodziny receptorów. Pełne sekwencje cDNA nobliści ustalili przeszukując bibliotekę cDNA utworzoną z RNA nabłonka węchowego.

U myszy wykryto około 1000 genów kodujących receptory zapachowe, w tym 638 to pełne geny prawdopodobnie kodujące funkcjonalne białka. Intrygujące było, co podkreśla Axel, że geny te stanowią 3–5% genomu myszy. U człowieka zidentyfikowano 339 pełnych genów, które kodują białka należące



Ryc. 3. Pierwsze etapy procedury użytej do identyfikacji genów receptorów zapachowych.

do 172 podrodziny receptorów zapachowych. (Podział na podrodziny oparto na obserwacji, że receptory, których sekwencja aminokwasowa jest identyczna przynajmniej w 60%, rozpoznają cząsteczki zapachowe o podobnej strukturze.) Wyniki opublikowanej w Cell pracy, oprócz odkrycia nowej wielogenowej rodziny kodującej receptory zapachowe, wskazywały również, że pobudzenie neuronów węchowych zachodzi poprzez uruchomienie ścieżki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, związanej z aktywacją receptorów sprzężonych z białkiem G, wytworzeniem wtórnych przekazników i zmianą przewodności błonowych kanałów jonowych. Ponadto stały się one podwaliną do dalszych badań zmysłu węchu. Mianowicie, znając geny odpowiedzialne za kodowanie poszczególnych receptorów zapachowych, można było przystąpić do dalszych prac wykorzystujących techniki hybrydazyjnej oraz zwierzęta transgeniczne. Stosując taki warsztat metodyczny wykazano, że w nabłonku węchowym są cztery strefy, gdzie poszczególne receptory zapachowe występują w rozproszeniu w sposób niezachodzący na siebie.

Przeprowadzono również doświadczenia, w których sprawdzano, czy pojedynczy neuron węchowy ma ekspresję wielu, czy też tyl-

ko jednego receptora zapachowego. W tym celu wyizolowano neurony z nabłonka węchowego i umieszczono je w odpowiednim środowisku. Za pomocą obrazowania zmian wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia zidentyfikowano te neurony, które na określoną substancję zapachową odpowiadały zmianą fluorescencji. Z tych pojedynczych neuronów otrzymywano RNA, a w następnym etapie cDNA i przeprowadzano reakcję PCR. Produkty reakcji zsekwencjonowano. Okazało się, że w indywidualnym neuronie węchowym zachodzi ekspresja tylko jednego genu receptora zapachowego. Wobec tego, powstaje pytanie jak rozpoznawane są tysiące substancji zapachowych, które mają zbliżoną strukturę, a dają odczucie zupełnie innych zapachów? Wytłumaczenie uzyskano na podstawie badań elektrofizjologicznych, w których mierzono odpowiedzi pojedynczych neuronów węchowych (a więc z ekspresją receptorów zapachowych jednego rodzaju) na różne substancje zapachowe. Z badań tych wynikało, że jeden receptor może rozpoznawać wiele substancji zapachowych

Receptor zapachowy	Substancja															
	S 1	S 3	S 6	S 18	S 19	S 25	S 41	S 46	S 50	S 51	S 79	S 83	S 85	S 86		
Kwas masłowy																
Kwas walerianowy																
Kwas kapronowy							●									
Kwas heptanowy	●				●	●		●	●		●	●				
Kwas kaprylowy	●			●	●			●	●		●	●		●		
Kwas pelargonowy	●			●	●			●	●		●	●		●		
Pentanol		●														
Heksanol		●					●									
Heptanol		●			●	●										
Oktanol				●	●			●			●					
Nonanol				●	●			●			●		●			
Kwas bromomasłowy															●	
Kwas bromowalerianowy															●	
Kwas bromokapronowy					●			●							●	
Kwas bromokaprylowy	●			●	●			●	●		●	●		●	●	
Kwas adypinowy															●	
Kwas pimelinowy															●	
Kwas oktanodiowy			●									●			●	
Kwas nonanodiowy			●						●		●				●	

Ryc. 4. Odpowiedzi neuronów węchowych z ekspresją genu określonego receptora na różne substancje.

Małe kółka oznaczają słabą odpowiedź neuronu na daną substancję zapachową (wg MALNIC i współaut. 1999, zmodyfikowana).

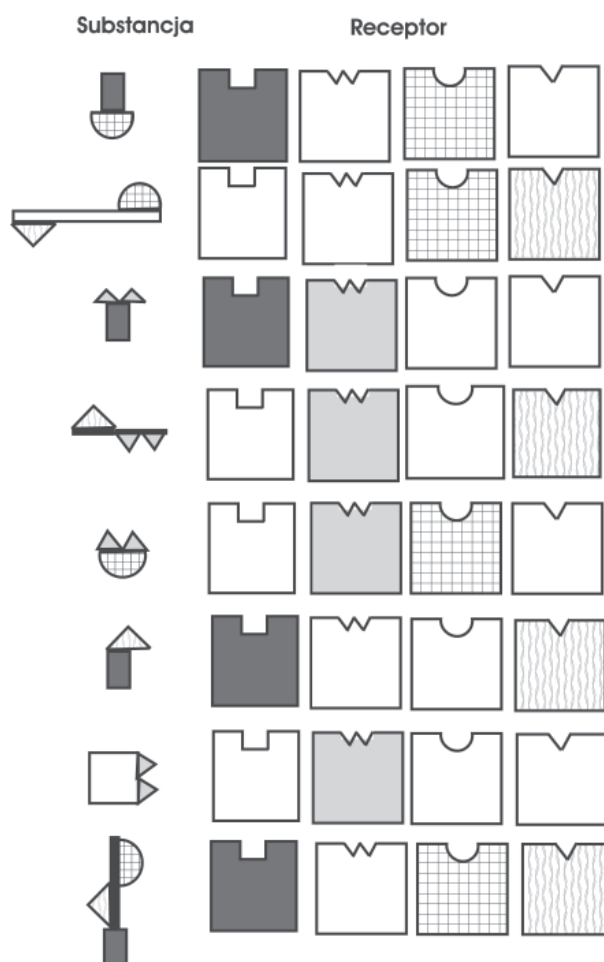
Substancja \ Receptor	S1	S3	S6	S18	S19	S25	S41	S46	S50	S51	S79	S83	S85	S86	Zapach
Kwas heksanowy (kapronowy)					■										nieprzyjemny
heksanol		■				■									przyjemny
Kwas heptanowy	■			■	■		■			■	■				nieprzyjemny
Heptanol		■			■	■									przyjemny
Kwas oktanowy (kaprylowy)	■			■	■		■	■	■	■	■				nieprzyjemny
Oktanol				■	■		■	■		■					przyjemny
Kwas nonanowy (pelargonowy)	■			■	■		■	■		■		■			nieprzyjemny
Nonanol				■	■		■	■		■		■			przyjemny

Ryc. 5. Jedna substancja zapachowa pobudza wiele receptorów.

Przykłady odpowiedzi neuronów węchowych z ekspresją danego receptora zapachowego na określoną substancję zapachową (wg MALNIC i współaut. 1999, zmodyfikowana).

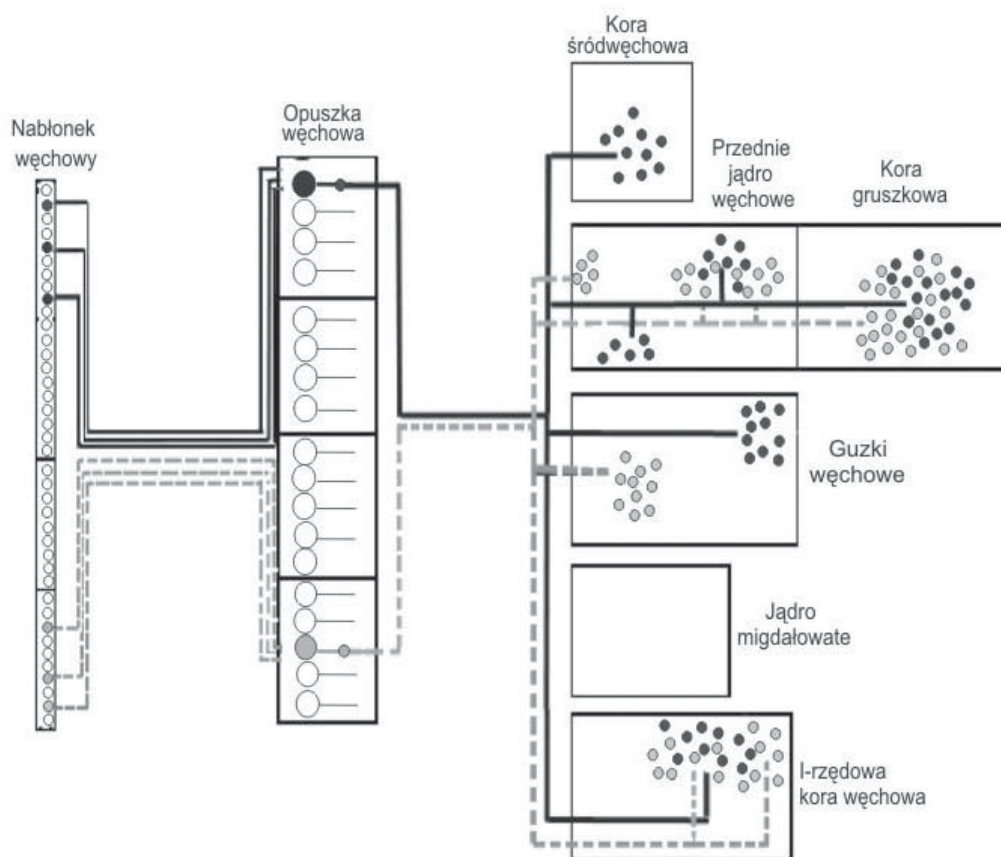
(Ryc. 4). Ponadto odkryto, że jedna substancja zapachowa może być rozpoznawana przez wiele typów receptorów (Ryc. 5). Wobec powyższego wnioskowano, że istnieje złożony kod receptorowy, według którego określona substancja zapachowa pobudza zdefiniowany zespół neuronów węchowych, z których każdy ma tylko jeden rodzaj receptora (Ryc. 6). Daje to niewyobrażalną liczbę kombinacji umożliwiającą zarówno identyfikację substancji zapachowej, jak i zdolność do odczuwania zmian jej stężenia. Na pierwszym etapie przetworzenia informacji zmysłowej w nabłonku węchowym dochodzi do analizy informacji niesionej przez substancje zapachowe. Dana substancja zapachowa pobudza w jamie nosowej określoną kombinację neuronów węchowych.

Problem, jak w mózgu reprezentowana jest informacja węchowa, stanowił dalsze wyzwanie dla obojga laureatów. Zastosowanie technik biologii molekularnej umożliwiło poznanie organizacji dróg nerwowych przenoszących informację węchową z neuronów z określonym receptorem zapachowym do wyższych pięt układu nerwowego. Uzyskano myszy transgeniczne, w których nabłonku węchowym można było uwidocznić (w reakcji barwnej) tylko neurony z ekspresją konkretnego genu receptora zapachowego. Wyniki tych badań pokazały, że aksony neuronów węchowych tworzą w opuszce węchowej kłębki (glomerule). Takich kłębków u myszy jest 1800, po 2 z aksonów neuronów, w których zachodzi ekspresja tego samego genu receptora zapachowego. W kłębkach znajdują się synapsy utworzone z komórkami mitral-



Ryc. 6. Schemat złożonych kodów receptorowych dla różnych substancji zapachowych.

Receptory rozpoznające określoną substancję są przedstawione jako figury z zapełnionym polem. (wg MALNIC i współaut. 1999, zmodyfikowana).



Ryc. 7. Schemat organizacji dróg węchowych biegnących z neuronów węchowych z ekspresją genu receptora zapachowego A (oznaczony kolorem czarnym) i neuronów z ekspresją genu receptora zapachowego B (oznaczony kolorem szarym) (wg ZOU i współaut. 2001, zmodyfikowana).

nymi opuszki. W ten sposób dzięki konwergencji aksonów tworzy się w opuszce stereotypowa przestrzenna mapa. Mapa ta jest stała u przedstawicieli danego gatunku i nie ulega zmianie, mimo że neurony nabłonka węchowego żyją zaledwie 2 miesiące i po tym okresie są zastępowane przez nowe komórki. Kod receptorowy jest reprezentowany przez rozproszone zespoły neuronów w nabłonku węchowym nosa, w opuszce zaś przez specyficzną kombinację kłębków. Na tym etapie nadal istnieje segregacja wejść z poszczególnych receptorów zapachowych (Ryc. 7).

Inne badania pozwoliły prześledzić drogę, jaką bodziec z określonego receptora zapachowego dociera do wyższych piętér układu nerwowego. Zastosowano w nich znacznik – lektynę jęczmienia. Co ważne, substancja ta może być transportowana poprzez synapsy. Uzyskano myszy transgeniczne, u których ekspresja genu lektyny jęczmienia zachodziła łącznie z ekspresją genu receptora węchowego określonego rodzaju. Pozwoliło to wyzna-

czyć przebieg połączeń biegnących od indywidualnych neuronów węchowych, z ekspresją genu danego receptora, do różnych obszarów mózgu. Obecność lektyny jęczmienia uwidaczniano immunocytochemicznie. W ten sposób w korze węchowej wykryto stereotypowe mapy sensoryczne. Są one dwustronnie symetryczne i mają stałą lokalizację u wszystkich osobników szczepu z wprowadzonym (ang. knock-in) genem. Okazało się ponadto, że mapy odpowiadające różnym receptorom zapachowym przynajmniej częściowo nachodzą na siebie przestrzennie. Można zatem przypuszczać, że pojedynczy neuron korowy może otrzymywać wejścia z wielu receptorów zapachowych. Natomiast bodźce z tych samych receptorów zapachowych docierając do różnych węchowych obszarów korowych, umożliwiają równoległą i, być może, zróżnicowaną obróbkę tych samych bodźców zmysłowych (Ryc. 7). Neurony korowe integrują informację zapachową, co umożliwia odczucie zapachu.

SENSE OF SMELL – THE ODORANT RECEPTOR CODE, NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE IN 2004

Summary

Two American molecular biologists Richard Axel and Linda Buck won the Nobel Prize for physiology or medicine in 2004. They discovered a large gene family that gives rise to many olfactory receptors.

The discovery allowed to explore how the brain discriminates among different odors and to reveal, using a genetic approach, the organization of the olfactory system.

LITERAURA

AXELOWI R., BUCK L., 1991. *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. Cell 65, 175–187.

MALNIC B, HIRONO J., SATO T., BUCK L. B., 1999. *Combinatorial receptor codes for odors*. Cell 96, 713–723.

ZOU Z., HOROVITZ L. F., MONTMAYEUR J-P., SNAPPER S., BUCK L. B., 2001. *Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex*. Nature 414, 173–179.